Brand-New item

Emerald Lucリポーターアッセイシステム*in vitro*発光試薬／細胞溶解剤

Emerald Luc Luciferase Assay Reagent / Lysis Solution

NEW

ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼのリポーターアッセイシステムの登場です

発売キャンペーン!

アッセイ試薬購入の方にプロモーター挿入用ベクター（pELuc-test）を無償でご提供いたします（期間 ～2007年9月28日ご注文分）

Emerald Lucシステムは、ブラジル産ヒカリコメツキムシに由来するルシフェラーゼを採用した高感度なリポーターアッセイシステムです。本システムで使用されているブラジル産ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼは従来のホタルルシフェラーゼに比べ*in vitro*アッセイにおいて、安定で、強い発光シグナルを観察することができます。

新発売のEmerald Luc Luciferase Assay Reagent / Lysis Solutionを用いることで、高感度検出やハイスループット性を必要とするリポーターアッセイが可能になりました。

また、本システムは、時系列変動の解析、イメージングなど、生細胞を直接用いるリポーターアッセイにも応用可能です。

図1. Assay Reagent（左:1,000回用）とLysis Solution（右）

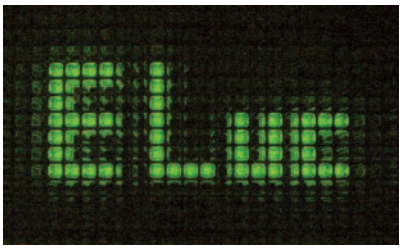


図2. 384穴プレートでの発光例

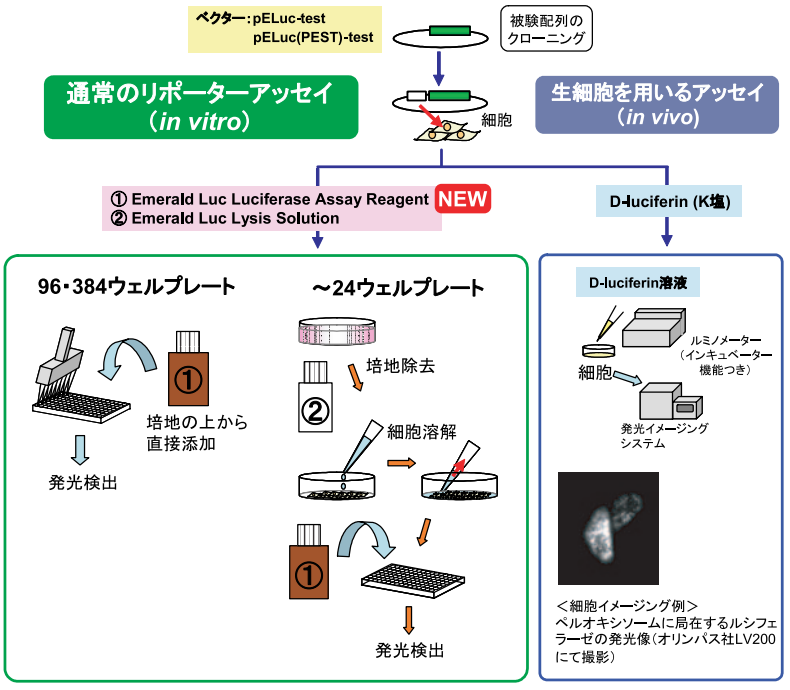


図3. Emerald Lucシステム概要

特長1 高シグナル・長持続性の発光

・ホタルルシフェラーゼと比べ、Emerald Lucルシフェラーゼは*in vitro*測定において約3倍の発光強度を示し、高感度な測定が可能です。また、高い発光安定性を示しますのでHTSアッセイに最適です。

特長2 ハイスループット解析に最適

・Emerald Luc Luciferase Asssy Reagentは溶解剤成分を含むため、細胞溶解・発光反応を1ステップで行うことができます。培養した細胞にそのまま培地と等量のEmerald Luc Luciferase Asssy Reagentを添加してインキュベートするだけで測定が可能です（図3）。

・96ウェルプレート、384ウェルプレートなど小スケールの細胞サンプルからの検出に最適です。

特長3 様々な解析に対応

・サンプルの一部を使って測定を行う場合には、Emerald Luc Lysis Solutionによって細胞溶解するステップを加えることができます。35mm以上のディッシュや24ウェル以下のマルチウェルプレートなど、培養スケールの大きな細胞サンプルからの検出に最適です（図3）。

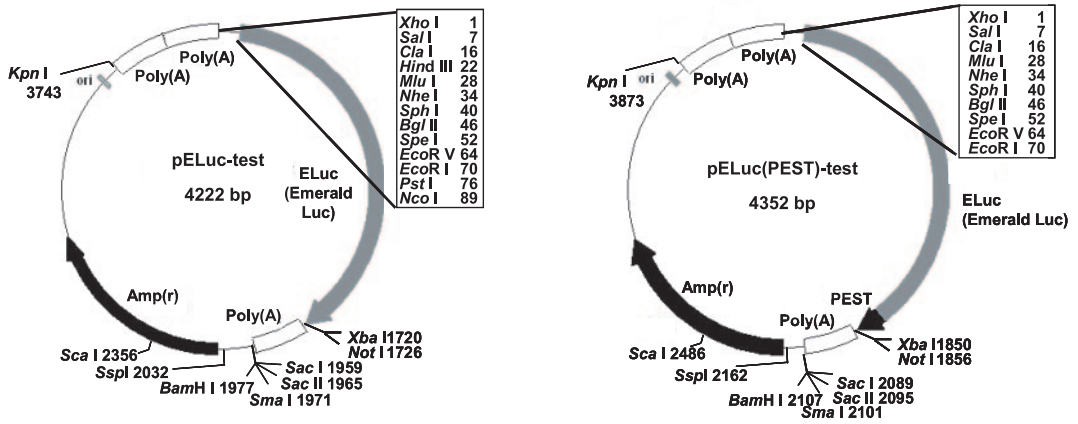


図4．Emerald Lucシステム用ベクター
（左）pELuc-test、（右）pELuc（PEST）-test

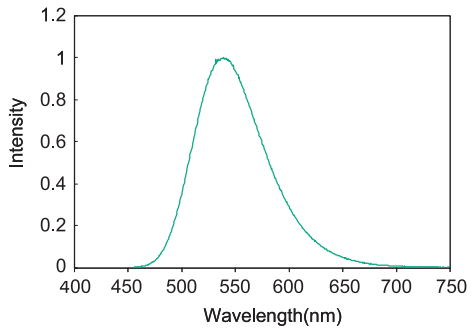
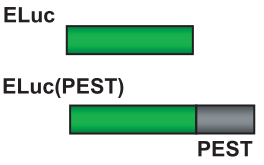


図5．Emerald Luc の発光スペクトル

一口メモ

Emerald Lucシステムのプロモーター挿入用ベクターとしてpELuc-test、pELuc（PEST）-testを販売しております。Emerald Luc（ELuc）は細胞内で非常に安定なルシフェラーゼです。ELuc（PEST）はルシフェラーゼの細胞内寿命を短くするために、ルシフェラーゼのC末端にPEST配列と呼ばれるタンパク質分解促進配列を付加しております。シグナル強度の高い検出を行うにはpELuc-testを、時計遺伝子のリズム解析などの動的な変動の検出にはpELuc（PEST）-testのご利用をお薦めします。詳細はUpload vol.85 p1,2または弊社ウェブサイトをご覧ください。

*Emerald Luc遺伝子について、特許出願中。



実施例1 ホタルルシフェラーゼとの*in vitro*検出における発光性能比較

SV40プロモーターの下流にELucおよびFLuc（ホタルルシフェラーゼ）を連結し、HeLa S3細胞にトランスフェクションしました。ELuc導入細胞にはEmerald Luc Luciferase Assay Reagentを、FLuc導入細胞には他社ホタルルシフェラーゼ検出用試薬AまたはBを、培養液と等量加え、10分間放置しました。その後、繰り返し発光を測定し、発光の強度・推移を調べました。右図上にシグナル計測値を、下に各組み合わせで最初の計測値を100としてプロットしました。

この結果、ELucはFLucの約3倍の発光強度を示し、安定性も非常に高い検出が可能であることがわかりました。

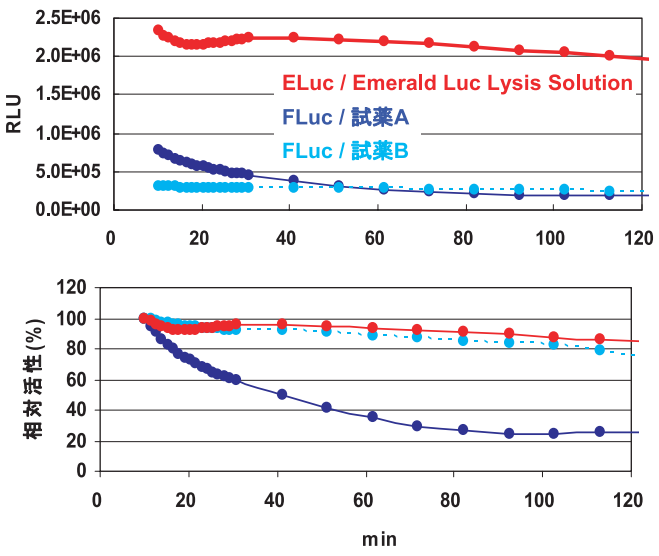


図6．*In vitro*でのルシフェラーゼ発光の安定性

実施例2 AP1応答及び阻害剤効果の検出

転写因子AP1は、プロテインキナーゼCの活性化を介して活性化される転写因子です。

Emerald Lucベクター（pELuc-test、Code No.: ELV-101）及びホタルルシフェラーゼベクターの各ルシフェラーゼ遺伝子上流にAP1結合配列、HSVtkプロモーターを挿入したコンストラクトを構築し、96ウェルプレートに播種したHeLa S3細胞にトランスフェクションしました。この細胞を、チロシンキナーゼ阻害剤AG555、AG825、AG1478、プロテインキナーゼC阻害剤Bisindolylmaleimide I（BDM）、Ro-32-0432（5μM）と1.5時間インキュベートしました。その後、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate（PMA）0.1μMを加え、5時間インキュベートしました。

インキュベート後、Emerald Luc Luciferase Assay Reagent、またはホタルルシフェラーゼ検出用試薬を培地と等量加え、ルシフェラーゼ活性を測定しました。各実験条件をn=3で実施し、平均値を下図グラフにプロットしました。

その結果、Emerald Lucシステムはホタルルシフェラーゼ系に比べシグナルが強く、さらに、n=3でのCVの平均がホタルルシフェラーゼ系では0.25であるのに対し、Emerald Luc系では0.14と低く、バラツキが小さく変動をより明確に解析することができました。本実験より、プロテインキナーゼCの阻害剤によってAP1による転写誘導が減少するという現象を、明確に捉えることができました。

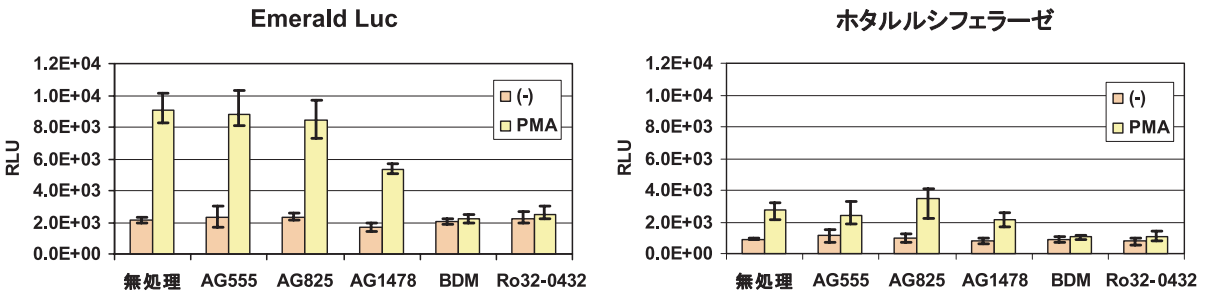


図7. プロテインキナーゼ阻害剤の効果の比較
グラフは各薬剤で処理した細胞に対して、PMA刺激を加えた時と加えなかったサンプルの各ルシフェラーゼの測定値をプロットしています。

品　名	包　装	保存温度	Code No.	価　格
Emerald Lucシステム破壊系発光試薬 **Emerald Luc Luciferase Assay Reagent***	10ml 100ml	-80℃	ELA-101 ELA-102	¥14,000 ¥78,000
Emerald Lucシステム細胞溶解剤 **Emerald Luc Lysis Solution****	100ml	-20℃	ELA-201	¥8,000
Emerald Lucプロモーター挿入用ベクター **pELuc-test*****	10μg	-20℃	ELV-101	¥35,000
Emerald Luc-Short lifeタイプ-プロモーター挿入用ベクター **pELuc（PEST）-test*****	10μg	-20℃	ELV-201	¥35,000

＊96ウェルプレートの場合、Emerald Luc Luciferase Assay Reagent 10mlは100反応、100mlは1,000反応に相当します。

＊＊Emerald Luc Lysis Solutionは希釈の必要がなく、そのままご使用いただけます。

＊＊＊ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼ遺伝子を含むベクターは、弊社にて特許出願した技術です。当ベクター（Emerald Luc Vector Code No.;ELV-101,ELV-201）の使用において、弊社の検出用試薬（Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Code No.; ELA-101, ELA-102, ELA-201, D-Luciferin Code No.; MRL-101, MRL-102）を用いる場合は、営利・非営利団体に関らず、ライセンス契約は必要ございません。営利団体で弊社の検出用試薬を用いない場合は、ライセンス契約が必要となります。製品にライセンスポリシーが添付されておりますので、開封前に必ずご確認ください。ご不明な点は弊社までお問い合わせください。

関連商品

品　名	包　装	保存温度	Code No.	価　格
D-luciferin（カリウム塩）	20mg 100mg	-20℃	MRL-101 MRL-102	¥24,000 ¥92,000

One-step RT-PCR Kit

RT-PCR Quick Master Mix

NEW

ワンステップRT-PCRキット「RT-PCR high -Plus-〈逆転一発〉」の改良版です

RT-PCR Quick Master Mixは、rTth DNA polymeraseを使用した、1酵素・1ステップ系のキットです。ホットスタートにも対応し、より高感度な検出が可能となりました。

特長1 検出感度100倍アップ

・ホットスタート法の採用や反応バッファーの改良によって、従来品の100倍の感度で検出が可能になりました（当社比）。また、再現性も向上しています。

特長2 簡便な1ステップ

・RNAを鋳型として、逆転写反応とPCRとを同一の反応系で行うため、ハイスループット化に適しています。また、反応液はMaster Mixとなっており、より簡便に実験することができます。

特長3 立体構造を取りやすいRNA鋳型や、GC-richな標的配列にも対応

・逆転写反応を高温で実施するため、立体構造をとりやすい鋳型RNAの反応にも適しています。遺伝子特異的プライマーのプライミングの特異性も高めます。更に、rTth DNA polymeraseはGC-richな配列の増幅に有効であることが知られており、高い増幅効率が期待できます。

一口メモ

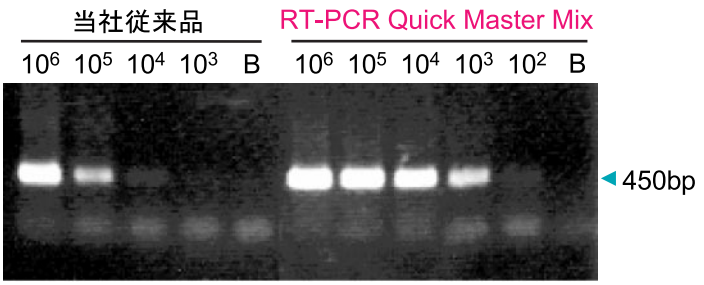
rTth DNA polymeraseは、好熱細菌*Thermus thermophilus*から分離されたpol I型DNA polymeraseです。Mnイオン存在下で逆転写活性を示すユニークな性質を有しています。

（参考文献） *Biochemistry*, **30**, : 7661-7666 （1991）
※本酵素の基本特許は弊社が有しています。

実施例 当社従来品との感度比較

キットに添付のポジティブコントロールRNA*とプライマーセットを使用し、ヒトG3PDH mRNAの約450bpの領域を標的としたRT-PCRを行いました。RT-PCR Quick Master Mixは、当社従来品と比べて2桁以上の高感度を示しました。

サンプル:ヒトG3PDH mRNA*
（10^6～10^2コピー／50μl反応系）
B:ブランク反応



＊*in vitro* transcriptionにて調製しました。

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
RT-PCR Quick Master Mix 2×RT-PCR Quick Master Mix 50mM $Mn(OAc)_2$ Positive Control RNA（human G3PDH） Positive Control Primer Set Nuclease-free Water	50回用	-20℃	PCR-311	¥45,000

Brand-New item

高効率ライゲーション試薬

Ligation high Ver.2

発売キャンペーン 30%off

NEW

■期間：2007年5月14日～2007年6月29日（ご注文分）

おなじみの高効率ライゲーション試薬『Ligation high』にバージョン2が新登場!!

Ligation high Ver.2は、高効率な1液タイプのライゲーション試薬です。様々な末端を持つDNA断片の連結反応に広く用いることができます。

特長1 ライゲーション効率アップ

・特にTAクローニングの効率が大幅にアップしました。
・多くの場合、30分以内の反応でも十分な数のポジコロニーを取得可能です*。
*標準プロトコールでは反応時間を30分に設定しています。

特長2 -20℃保存で凍結しません

・フリーザーから取り出してすぐにご使用いただけます。

特長3 便利な1液タイプ

・使い方は、従来品同様、DNA断片と混合するだけで簡単です。

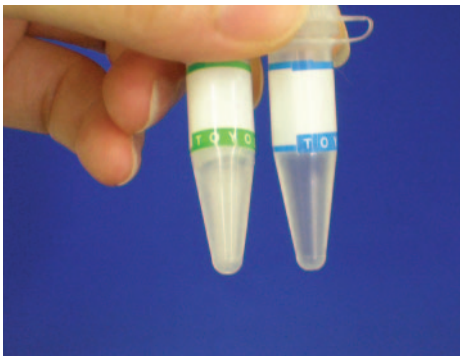
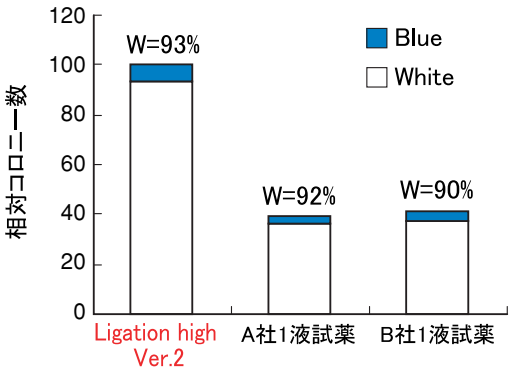


図1．-20℃保存での試薬の状態
従来品（緑）、本製品（青）
本製品は-20℃保存で凍結しません。

実施例

Tベクター〈50ng〉にλDNAの0.5kb PCR増幅断片（Taq DNA polymeraseで増幅後精製）をモル比で1:3となるように混合し、16℃で30分間ライゲーション反応を行いました。その後、Competent cell DH5αを形質転換してプレーティングし、翌日、白コロニー数（インサートあり）と青コロニー数をカウントしました。右図は、Ligation high Ver.2を用いたときに出現したコロニー数を100として、比較したデータです。結果、Ligation high Ver.2を用いることで高効率にTAクローニングが可能になることが明らかとなりました。



品　名	包　装	保存温度	Code No.	価　格	キャンペーン価格
Ligation high Ver.2	750μl×1本	-20℃	LGK-201	¥22,000	¥15,400

*1反応に7.5μl使用する場合、100回用としてご使用いただけます。

関連商品

品　名	包　装	保存温度	Code No.	価　格
Competent high JM109	0.1ml×10本*	液体窒素	DNA-900	¥17,000
Competent high DH5α	0.1ml×10本*	液体窒素	DNA-903	¥17,000

*他にSOC培地1ml×10本、およびPositive Control Plasmidを含みます。

平滑末端クローニング

知っているようで、少し自信がない。本コーナーでは、そのようなプロトコールを詳しく解説いたします。

はじめに

最近、KOD DNA polymeraseなどの平滑末端を生じる高正確性酵素を用いて増幅を行う機会が増え、平滑末端クローニングを行う回数も多くなっているのではないでしょうか？ 今回は、そのような平滑末端を有するDNA断片のクローニング方法および周辺技術について詳しく解説いたします。

今回説明する作業を以下のように図式化しました。ここでは、主にこのフロー図に沿って説明いたします。

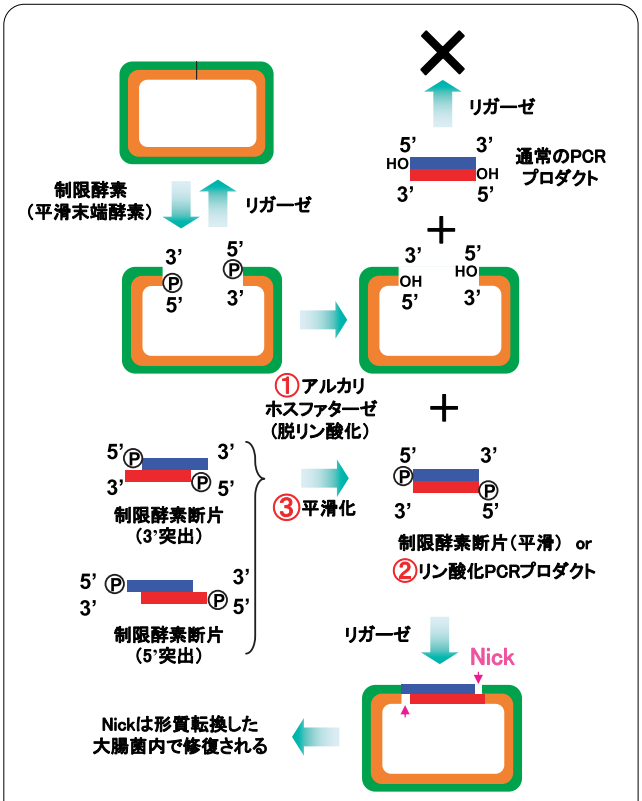


図1．平滑末端クローニングのフロー

方　法

1.ベクターの脱リン酸化

【*E. coli* Alkaline Phosphatase（Code No.:BAP-111）】

平滑末端サイトを用いてDNA断片をクローニングする場合、ベクターがセルフライゲーションしないようにベクターを脱リン酸化して使用することが一般的です。制限酵素で消化したDNAの5'末端にはリン酸基が残っており、リン酸基を除去することでライゲーションされなくなります。

以下に、*E. coli* Alkaline Phosphataseを用いるプロトコールを示します。この酵素は耐熱性が高く容易に失活しないため、反応後の精製が必要ですが、手間を惜しまなければ最も確実な方法です。以下に方法をご紹介します。

（1）制限酵素処理

1～5μgのベクターを、制限酵素を用いて完全消化します。このとき、切れ残りがあると、クローニングの効率が低下しますので、電気泳動で切れ残りが確認できなくなるまで念入りに消化します。精製時のロスを考えて少し多めのベクターでスタートすることをお薦めします。

（2）精製

アルカリホスファターゼ処理を確実に行うために精製*を行います。精製後、DNAを80μlの滅菌水中に溶出（溶解）してください。

*精製には、磁性ビーズを利用したDNAフラグメント精製キット「MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-（Code No.:NPK-601）」が便利です。

（3）アルカリホスファターゼ処理（脱リン酸化処理）

精製DNA溶液（0.5～2.5μg）	80（μl）
10×Buffer	10
E. coli Alkaline Phosphatase（0.1～1U/μl）*	10
Total	100 μl

↓

平滑末端、3'突出末端 → 60℃, 60min

5'突出末端 → 37℃, 60min

*目安として5～20pmolesの5'末端に対して2Uですが、添加できる最大量（最終液量の10%）を添加することでほとんどの場合、問題なく脱リン酸化できます。

（4）アルカリホスファターゼ処理後のベクターの精製

〈この精製は必ず行ってください〉

酵素が残留すると以下の実験に大きな影響を及ぼします。実験書などではフェノール/クロロホルム処理が必要であると書かれていますが、MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-*を用いると簡単に精製可能です。

*実験のコツを「私にもできた！ ライフサイエンス実験シリーズVol.1」に紹介しています:弊社ウェブサイトwww.toyobo.co.jp/bioの「実験お助けコーナー」でご覧いただけます。

2.リン酸化PCR産物の調製

【T4 polynucleotide kinase（Code No.:PNK-111）, rATP（Code No.:ATP-111）】

一般的にPCRに用いられているプライマーの5'末端はリン酸化されていません。よって、KOD -Plus-などの平滑末端PCR産

物*は、そのままでは脱リン酸化処理したベクターにはクローニングすることができません。ここでは、プライマーをあらかじめリン酸化しておいてPCRを行う方法と、PCR産物をリン酸化する方法をご紹介します。

＊3'-5'エキソヌクレアーゼ活性（校正活性）を有する高正確性酵素で増幅したDNA断片の末端は平滑化されています。

●リン酸化プライマーを用いる場合

（1）50pmole/μl（μM）以上のPrimer溶液を準備します。

（2）以下のように混合、反応させます。

Primer（50pmole/μl［50μM］）	14（μl）
10×Protruding End Kinase Buffer*1	2
10mM rATP*2	2
T4 Polynucleotide Kinase（5～20U/μl）*3	2
Total	20 μl

↓

37℃、1h反応

↓

95℃、5min（T4 Polynucleotide Kinaseを失活）

↓ ← 50μl 滅菌ミリQ水を添加

10pmole/μl［10μM］primer溶液として使用します*4*5

↓

高正確性酵素を用いてPCRを行います

＊1 T4 Polynucleotide kinaseに添付されています。
＊2 別途準備する必要があります。
＊3 Kinaseは添加できる最大量を添加します（最終液量の10%）。
＊4 このままPCR反応に使用します。
＊5 凍結して何度でも使用可能です。

●PCR産物をリン酸化する場合

（1）高正確性PCR酵素で増幅したPCR産物を精製します。

（2）以下のように混合、反応させます。

精製PCR産物（～1μg）	35（μl）
10×Blunt End Kinase Buffer*1	5
10mM rATP*2	5
T4 Polynucleotide Kinase（5～20U/μl）*3	5
Total	50 μl

↓

37℃、1h反応

↓

精 製*4

＊1 T4 Polynucleotide kinaseに添付されています。
＊2 別途準備する必要があります。
＊3 Kinaseは添加できる最大量を添加します（最終液量の10%）。
＊4 MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-（Code No. NPK-601）を用いることができます。

3.DNA断片のブランティング（平滑化）
【Blunting high（Code No.:BLK-101）】

Blunting highは高効率なブランティングキットです。本キットに用いられているKOD DNA polymeraseは、3'突出部分を削り、5'突出部分を埋める活性を有しています。このキットには、高効率ライゲーションキット:Ligation highも含まれており便利です。ブランティングのプロトコールは以下のとおりです。

DNA溶液	X（μl）
10×Blunting Buffer	1
KOD（2.5U/μl）	1
滅菌水	8-X
Total	10 μl

↓

72℃、2min

4.TAクローニング
【TArget Clone™ -Plus-（Code No.:TAK-201）】

KOD -Plus-やKOD FXなどの高正確性PCR酵素で増幅したDNA断片は、そのままではTAクローニングすることができませんが、TArget Clone™ -Plus-を用いることで、高効率にTAクローニングすることが可能です。原理を図2に示します。抗KOD DNA polymerase抗体でKOD DNA polymeraseの3'−5'エキソヌクレアーゼ活性を抑えておき、Taq DNA polymeraseのTdT活性によってPCR産物にdAを付加して、そのままTベクターに連結することができます。

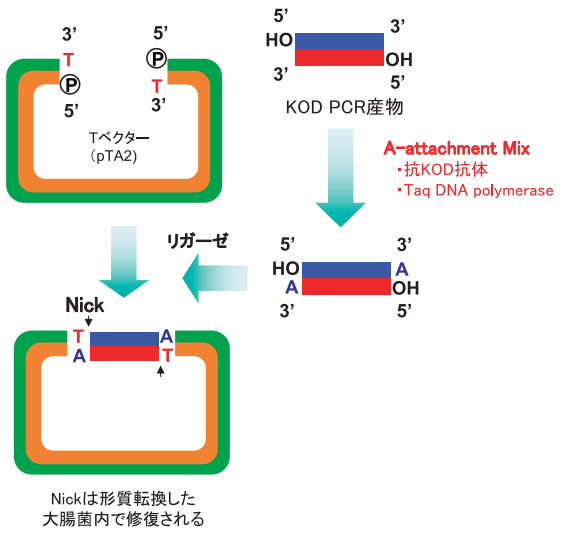


図2．TArget Clone™ -Plus-を用いたKOD PCR産物のTAクローニング

PCR産物	9（μl）
10×A-attachment Mix*	1

→ 60℃, 10min

＊Taq DNA polymeraseと抗KOD抗体が含まれます。

DW	（3-X）（μl）
2×Ligation Buffer	5
pTA2 Vector	1
上記反応物	X
T4 DNA Ligase	1

→ 室温, 30min → 形質転換

5.方向性の確認
【Blend Taq® (Code No.BTQ-101)】

平滑末端クローニングやTAクローニングを行った場合、DNAが両方向に挿入されるため、方向性の確認が必要です。インサートの確認は通常、ベクター上に設計したプライマーを用いるコロニーダイレクトPCRなどによって確認しますが、その方法ではインサートの有無だけのチェックしかできません。片方をベクター上、もう片方をインサート上に設計したプライマーを用いるPCRを行うことによって、インサートの有無と同時に方向性を確認することが可能です。以下に、Blend Taq®を用いるコロニーダイレクトPCRの例をお示しします。Blend Taq®はコストパフォーマンスに優れた高性能PCR酵素であり、KOD Dash®とともにコロニーダイレクトPCRに適している酵素です。

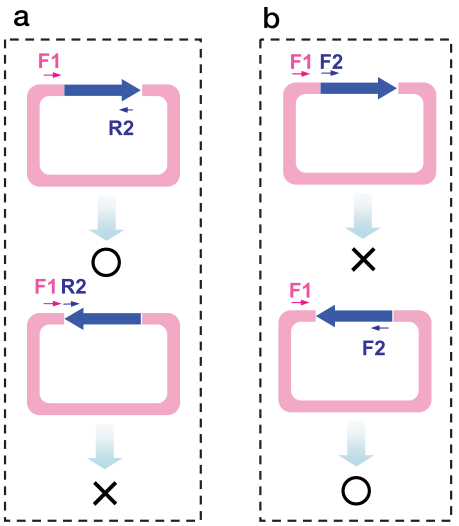


図3. PCRによる方向性の確認
ベクター、およびインサート上に設計したプライマーを用いてPCRを行います。aもしくはbの組み合わせで得られる増幅パターンより方向性を確認できます。

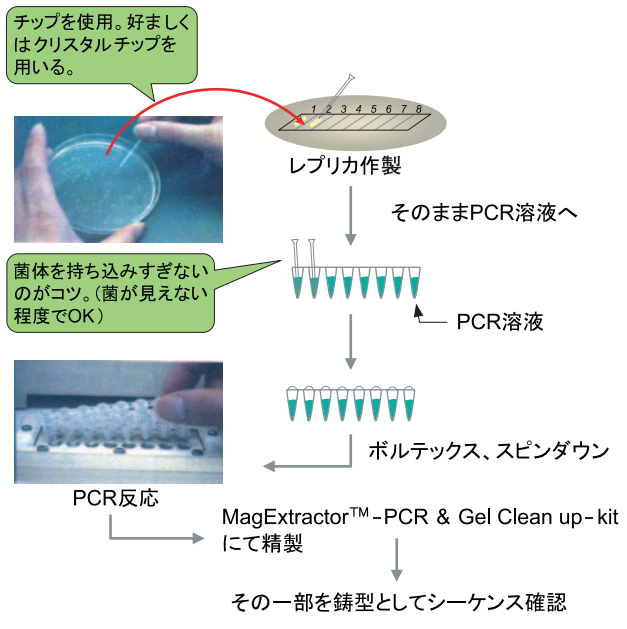


図4. コロニーダイレクト PCRの操作フロー

D.W.	21.9 (μl)
10×Buffer for Blend Taq®	3
2mM dNTPs	3
Forward primer (10pmole/μl)	0.9
Reverse primer (10pmole/μl)	0.9
Blend Taq®	0.3
Total	30 μl

94℃ 4min → 94℃ 30sec → A℃ 30sec → 72℃ Bmin (×30 cycles)
(Tm-5～10℃) (1kb / 1min)

図5に、TAクローニング後にコロニーダイレクトPCRによってインサートの方向性を確認した例をご紹介します。F1-R2、およびF1-F2の組み合わせにおいて、インサートの方向性に依存して増幅が認められます(それぞれ相補的な関係になっています)。この方法を用いることで、インサートチェックの段階でクローンを絞り込むことができ、その後の解析をよりスムーズに進めることができます。

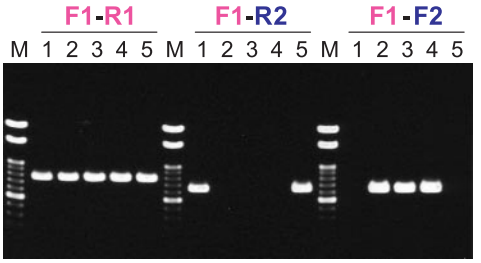


図5. コロニーダイレクトPCRの一例
0.5kbのPCRプロダクトをTAクローニングした後、図3に示した様々なプライマーの組み合わせを用いてコロニーダイレクトPCRを行いました。(R1はベクター上に設計したリバースプライマー)
M：100bpラダーマーカー
1～5：各コロニー

おわりに

今回は両方が平滑末端のDNA断片のクローニング方法を中心に解説しましたが、片方が平滑末端で、もう一方が付着末端の場合の便利なクローニング方法を「私にもできた! ライフサイエンス実験シリーズVol.1」に詳しく紹介しています(弊社ウェブサイト[www.toyobo.co.jp/bio]の「実験お助けコーナー」でご覧いただけます)。この方法で連結した場合、どこにNickができるかなども一度頭の中でシュミレーションしてみてはいかがでしょうか。このシリーズでは、日常の実験に役立つ様々なプロトコールを紹介させていただく予定です。

関連商品

品　名	包　装	保存温度	Code No.	価　格
脱リン酸化酵素 ***E. coli* Alkaline Phosphatase**	100U×1本	-20℃	BAP-111	¥15,000
高効率DNA断片精製キット **MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-**	200回用	室温	NPK-601	¥25,000
磁性スタンド **Mag*ical Trapper***	1個	室温	MGS-101	¥38,000
リン酸化酵素 **T4 Polynucleotide Kinase**	1,500U×1本	-20℃	PNK-111	¥15,000
rATP	50μmoles/0.5ml	-20℃	ATP-111	¥15,000
高効率平滑化+Ligation **Blunting high**	20回用	-20℃	BLK-101	¥25,000
KOD PCRプロダクトのTAクローニング **TArget Clone™ -Plus-**	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000
高効率ライゲーションキット **Ligation high**	375μl×2本	-20℃	LGK-101	¥20,000
TAクローニング効率をさらにアップ。-20℃で凍結しません。 **Ligation high Ver.2** （本誌p.5）	750μl×1本	-20℃	LGK-201	¥22,000 NEW
高性能Taqポリメラーゼ **Blend Taq®**	250U×1本	-20℃	BTQ-101	¥19,000
高効率ポリメラーゼ **KOD Dash®**	250U×1本	-20℃	LDP-101	¥25,000
高効率コロニーダイレクトPCR試薬 **InsertCheck -Ready-（プライマーフリー）**	100回用	-20℃	PIK-151	¥29,000
高効率コロニーダイレクトPCR試薬（色素混合タイプ） **InsertCheck -Ready- *Blue*（プライマーフリー）**	100回用	-20℃	PIK-251	¥31,000
平滑末端を生じる代表的な高正確性ポリメラーゼ				
KOD -Plus-	200U×1本	-20℃	KOD-201	¥30,000
KOD -Plus- Ver.2	200U×1本	-20℃	KOD-211	¥32,000
KOD FX （本誌p.10）	200U×1本	-20℃	KFX-101	¥35,000 NEW

Web de 温故知新

過去に紹介した記事で、今号に関連のある記事をピックアップしてご紹介するコーナーです。

『ACP & MCP-tag』（本誌p.17-18掲載）

ACP/MCP-tagは、ACP/SFP synthase存在下、蛍光標識されたCoA誘導体に共有結合するユニークな約8kDaのタグです。膜タンパク質の細胞外ドメインなどとの融合タンパク質として発現させることにより、膜タンパク質を特異的に蛍光パルスラベルすることができます。

このタグを開発したCovalys社（http://www.covalys.com/）は、この他にも様々な性質を有するユニークなタグを開発しています。『SNAP-tag™』は約20kDaのタグであり、ベンジルグアニン誘導体を基質として共有結合する性質を有しています。ACP-tagに比べサイズは若干大きいですが、タグ自身が酵素活性を有するため、様々な用途に使用可能です。

膜タンパク質といえば、最近、膜タンパク質間での相互作用解析の研究が盛んです。Dualsystems社（http://www.dualsystems.com/）では、スプリットユビキチンシステムを用いた、膜タンパク質間相互作用を検出できるユニークなYeast two-hybrid systemを販売しています（『DUALmembrane system』）。

興味のある方は、弊社のwebサイト（http://www.toyobo.co.jp/bio）のサイト内検索に、「SNAP」「DUALmembrane」と入力してみてください。詳細情報をご確認いただけます。

TOYOBO

PCRは東洋紡

より長く、より確実に、をコンセプトに開発されたPCR試薬です。

Flexible KOD DNA polymerase

KOD FX

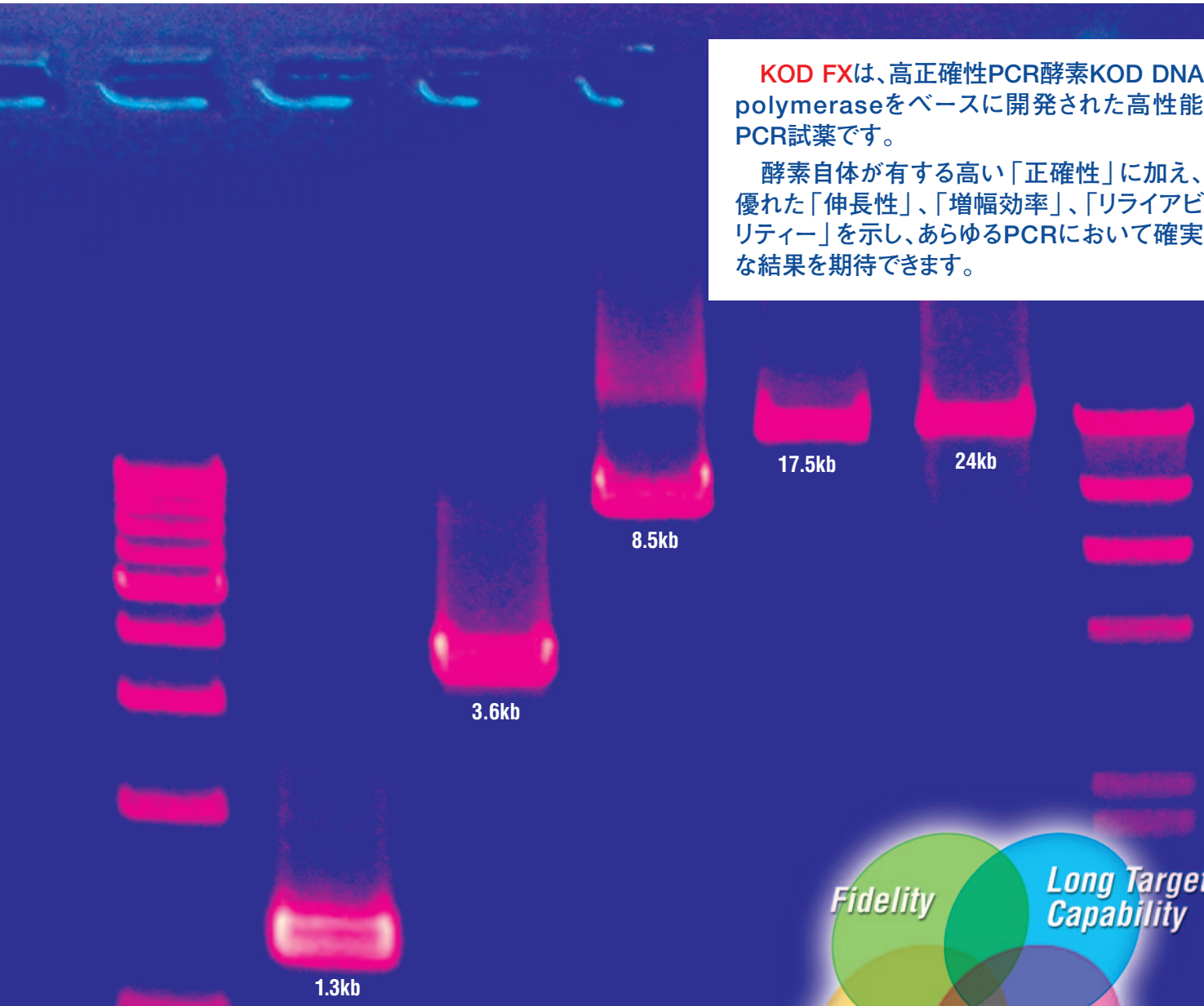
新発売

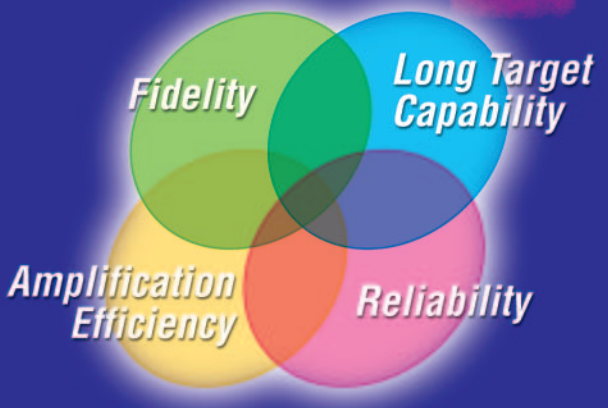
30%OFF キャンペーン

期間:2007年5月21日~8月31日ご注文分

KOD FXは、高正確性PCR酵素KOD DNA polymeraseをベースに開発された高性能PCR試薬です。

酵素自体が有する高い「正確性」に加え、優れた「伸長性」、「増幅効率」、「リライアビリティー」を示し、あらゆるPCRにおいて確実な結果を期待できます。





TOYOBO PCR酵素選択の目安

			正確性	伸長性	増幅効率(収量)	増幅成功率	増幅末端	伸長時間(/kb)	ホットスタート	
高正確、高効率に、幅広いPCRで応用可能		KOD FX	A	S	S	S	BE	1min	○	KOD FX
	高正確性PCRをしたい	KODシリーズ(KOD Dash®除く)	A	C	C	C	BE	30sec	–	KOD DNA Polymerase
			S	A	A	B	BE	1min	○	KOD -Plus-
			S	A	A	A	BE	1min	○	KOD -Plus- Ver.2
	高効率で汎用PCRをしたい	Blend Taq®シリーズ	C	S	S	A	AO	1min	–	Blend Taq®
			C	S	S	S	AO	1min	○	Blend Taq® -Plus-
		KOD Dash®	C	S	S	A	AO	30sec	–	KOD Dash®

S: Best, A: Excellent, B: Good, C: Satisfactory, BE: Blunt end, AO: A over hung

※写真:ヒトゲノムDNA増幅例

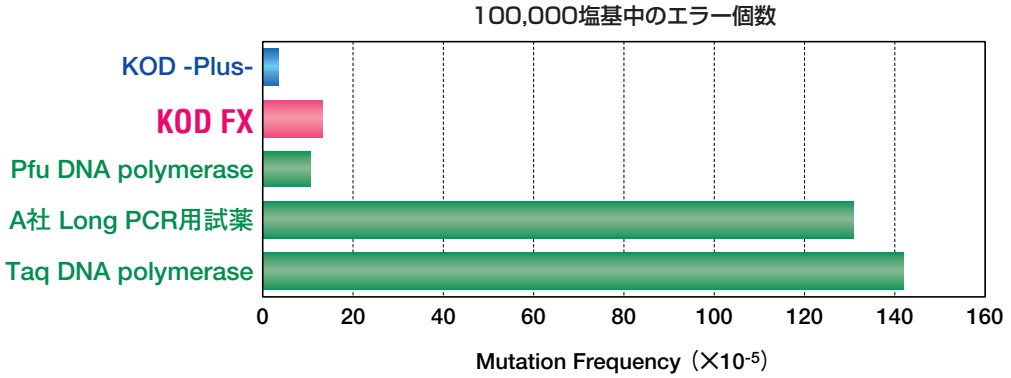
Flexible KOD DNA polymerase

KOD FX

正確性、伸長性、増幅効率、そしてリライアビリティー、全ての性能を高い次元で備えた新規PCR試薬です。

トップクラスの正確性 Fidelity (Accuracy)

KOD FXのPCRエラーによるミス塩基の取り込み頻度（エラー率）は、実際にシーケンシングにて解析した144,535塩基中、わずか19塩基でした。このエラー率は、Taqや他社Long PCR用酵素の約10倍優れている値でした。



PCRエラー率の測定方法

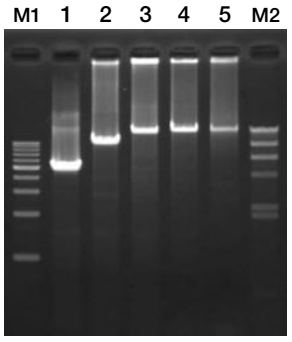
各酵素にてヒトゲノムDNAを鋳型にβ-globin領域2.4kbの増幅を行い、PCR産物をTAクローニング後、96クローンをピックしてシーケンシングを行い、配列を確認しました。

※KOD -Plus- Ver.2の正確性はKOD -Plus- とほぼ同等です。

優れた伸長性（増幅可能鎖長） Long Target Capability

KOD FXでは、λDNAを鋳型に40kb、ヒトゲノムDNAを鋳型に24kb、cDNAを鋳型に13.5kbの増幅が可能でした。

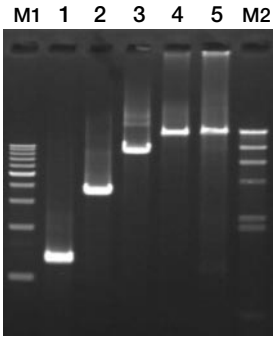
Template λDNA



鋳型：λDNA
10ng／50μl 反応系

M1： 1kb DNA ラダー
1： 5kb
2：10kb
3：20kb
4：30kb
5：40kb
M2：λ／*Hind*Ⅲ digest

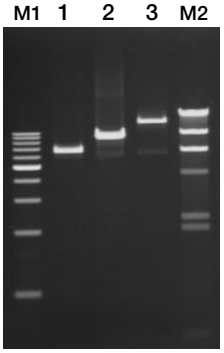
Template ヒトゲノムDNA



鋳型：ヒトゲノムDNA
50～200ng／50μl 反応系

M1： 1kb DNA ラダー
1：β-globin 1.3kb
2：β-globin 3.6kb
3：β-globin 8.5kb
4：β-globin 17.5kb
5：tPA 24.0kb
M2：λ／*Hind*Ⅲ digest

Template 逆転写反応液（cDNA）

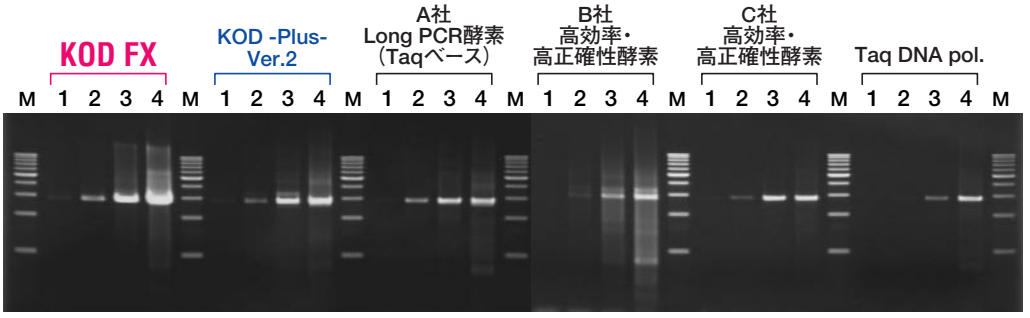


鋳型：逆転写反応液（ヒトcDNA）
total RNA 100ng相当／50μl 反応系

M1：1kb DNA ラダー
1：Homo sapiens polymerase (DNA directed), epsilon [NM_006231] 6.8kb
2：Homo sapiens insulin-like growth factor 2 receptor [NM_000876] 8.9kb
3：Homo sapiens dystrophin [NM_004006] 13.5kb
M2：λ／*Hind*Ⅲ digest

抜群の増幅効率 Amplification Efficiency

KOD FXでは、他社PCR酵素を圧倒的に上回る収量が得られ、少ない鋳型量からでも増幅が可能でした。



M：1kb DNA ラダー
1 ：鋳型量 0.1ng
2 ： 1ng
3 ： 10ng
4 ： 100ng

鋳型：ヒトゲノムDNA 0.1ng～100ng／50µl 反応系
ターゲット：β-globin 2.8kb

PCRサイクル条件：
94℃ 2min.
98℃ 10sec. ←
68℃ 3min. ┘ 30 cycles

＊他社酵素については、製品添付のプロトコールに従い30サイクルにて実施しました。

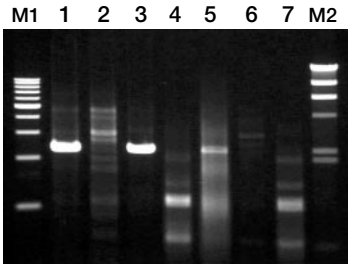
高い信頼性 Reliability

GC richターゲットの増幅

KOD FXでは、他社GC rich対応PCR試薬が増幅できないターゲットでも増幅が可能でした。

ヒト TGF-β 2.3kb

(GC含量約70%)

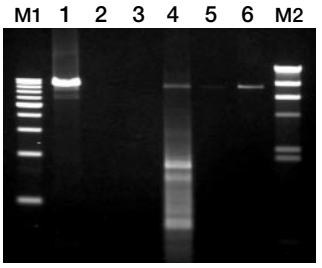


M1：1kb DNA ラダー
1 ：KOD FX
2 ：KOD -Plus-
3 ：KOD -Plus- +5% DMSO
4 ：A社Long PCR酵素(Taqベース)
5 ：B社高効率・高正確性酵素
6 ：C社高効率・高正確性酵素
7 ：Taq DNA pol.
M2：λ／*Hind*Ⅲ digest

鋳型：ヒトゲノムDNA 10ng／50µl 反応系

ヒト IGF2R遺伝子[NM_000876] 8.9kb

(GC含量約90%の領域を含むmRNA)

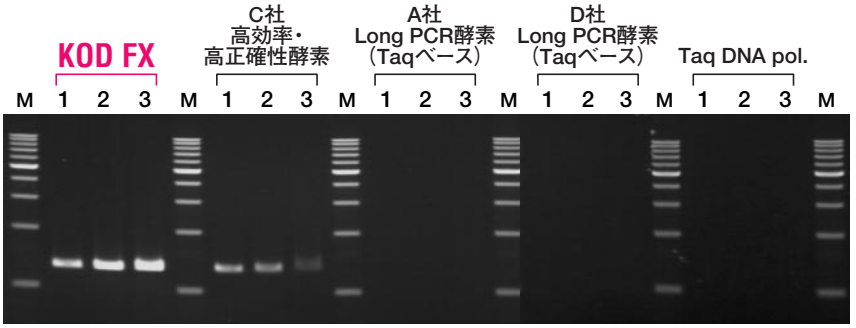


M1：1kb DNA ラダー
1 ：KOD FX
2 ：A社Long PCR酵素(Taqベース)
3 ：D社Long PCR酵素(Taqベース)
4 ：E社GCrich対応酵素(Taqベース)
5 ：F社GCrich対応高効率・高正確性酵素
6 ：G社GCrich対応高効率・高正確性酵素
M2：λ／*Hind*Ⅲ digest

鋳型：ヒトcDNA(HeLa Total RNA 50ng相当)／50µl 反応系

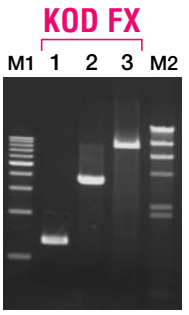
全血をサンプルとしたダイレクトPCR

KOD FXでは、全血をサンプル(鋳型)とした場合、他社品に比べ良好な増幅を示し、最長で8.5kbの増幅が可能でした。



M：1kb DNA ラダー
1 ：全血 1µl／50µl 反応系
2 ： 2µl
3 ： 4µl

ターゲット：β-globin 1.3kb



鋳型：ヒト全血
2µl／50µl 反応系

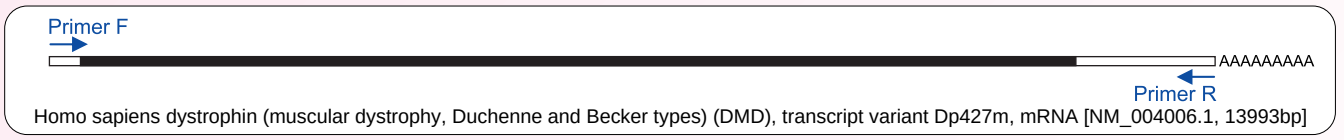
M1：1kb DNA ラダー
1 ：β-globin 1.3kb
2 ：β-globin 3.6kb
3 ：β-globin 8.5kb
M2：λ／*Hind*Ⅲ digest

PCRサイクル条件：
94℃ 2min.
98℃ 10sec. ←
68℃ 1min./kb ┘ 30 cycles

Flexible KOD DNA polymerase

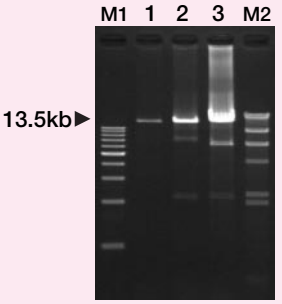
KOD FX 使用例 DMD 遺伝子（13.5kb）のPCRクローニングに挑戦

ヒトジストロフィン（DMD）遺伝子は、真核細胞における最も長いmRNAの一つです。ここでは、KOD FXを用いて本遺伝子の全長クローニングを行った例をご紹介します。



Homo sapiens dystrophin (muscular dystrophy, Duchenne and Becker types) (DMD), transcript variant Dp427m, mRNA [NM_004006.1, 13993bp]

- **逆転写反応**
  1st Strand 合成キット：ReverTra Ace -α-®（Code No.：FSK-101）
  RNA：Human Adult Skeletal Muscle total RNA（Code No.：CA1H60）1μg／20μl反応系
  逆転写Primer：Oligo（dT）20 primer
- **KOD FXを用いたPCR**
  Primer F：CATGGCCTTGTTGGCCTACTGGAGCAATAAAGTTTGAAGAACTTTTACCAGG
  Primer R：GACGGCCTATGTGGCCACAACACGAAATAATGTCCAAATTAATTATGC（下線部は*Sfi* Iサイト）
  PCRサイクル条件：94℃ 2min.
  98℃ 10sec. ←┐30 or 35 or 40 cycles
  68℃ 14min. ←┘
- **アガロースゲル電気泳動による増幅産物の確認**
- **残りのPCR増幅産物（35サイクル）をMagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-（Code No.：NPK-601）を用いて精製**
- **制限酵素*Sfi* I（Code No.：SFI-111）によるPCR産物の消化**
- **アガロースゲル電気泳動による分離、切り出し、DNA回収**
- **予め*Dra* IIIでカットしたPlasmid Vector pME13SFL3とligation**
- **大腸菌コンピテントセルDH5α（Code No.：DNA-903）を形質転換**
- **形質転換体5クローンのORF（約11kb）をシーケンシングにより配列確認**



アプライ量：10μl

M1：1kb DNA ラダー
1：30サイクル
2：35サイクル
3：40サイクル
M2：λ／*Hin*dIII digest

シーケンシングの結果、5クローン中1クローンにおいて、PCRエラーによる変異のないDMD遺伝子を取得することができました。

品名および内容	包　装	保存温度	Code No.	価　格	キャンペーン価格
KOD FX KOD FX（1U／μl） 2×PCR Buffer for KOD FX 2mM dNTP	200U×1本	-20℃	KFX-101	¥35,000	¥24,500
高効率TAクローニングキット **TArget Clone™ -Plus-**	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000	−

※KOD FXで増幅されたDNA断片は平滑化されているため、通常のTAクローニングはできません。TArget Clone™ -Plus-をお使いください。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE
Purchase of this product includes an immunity from suit under patents specified in the product insert to use only the amount purchased for the purchaser's own internal research. No other patent rights (such as 5' Nuclease Process patent rights) are conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

製品及び原理等でご不明な点がございましたら。
下記問い合わせ先までお気軽にお問い合わせください。

（ウェブサイトをリニューアルして見やすくなりました）

TOYOBO 東洋紡績株式会社
ライフサイエンス事業部（大阪）
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL.06-6348-3786　FAX.06-6348-3833
E-mail order_lifescience@bio.toyobo.co.jp
ライフサイエンス事業部（東京）
〒103-8530　東京都中央区日本橋小網町17番9号
TEL.03-3660-4819　FAX.03-3660-4951
E-mail order_lifescience@bio.toyobo.co.jp
Toyoboテクニカルライン
TEL.06-6348-3888
（9:00～12:00　13:00～17:00（土・日・祝を除く））
FAX.06-6348-3833
E-mail techosk@bio.toyobo.co.jp
Toyobo Web Site
[http://www.toyobo.co.jp/bio]

PCRは東洋紡

取扱店

『KOD -Plus- Mutagenesis Kit』を用いたルシフェラーゼ遺伝子へのHis-tag挿入、及びアミノ酸点変異ライブラリーの作製

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　杉山 明生

はじめに

Site-directed mutagenesis（部位特異的変異導入法）は、従来Kunkel法に代表されるように煩雑で時間の掛かるステップを伴いましたが、今日ではPCR法を応用した様々な方法が開発され、比較的簡便に行える手法となりました。しかしながら、変異導入率、簡便さ、導入できる変異の種類、あるいは、目的とする変異以外の変異の挿入率（2nd-site mutation）といった観点でみた場合、何れの方法も一長一短あるのが実情でした。

KOD -Plus- Mutagenesis Kit（図1）は、高正確性PCR酵素KOD -Plus-の高い正確性を活かした、Inverse PCR（iPCR）法に基づく部位特異的変異導入キットです。

Inverse PCR法の採用により、数bpの置換、挿入、欠失のみならず、数10bpの挿入や数100bpの欠失等、様々な種類の変異を高い効率で導入することができます（図2）。また、反応条件の最適化により、PCRエラーによる2nd-site mutationが入る可能性が最小限に抑えられており、さらに、大変簡便なプロトコールとなっています（図3）。

本稿では、KOD -Plus- Mutagenesis Kitを用いてルシフェラーゼ遺伝子へのHis-tag配列の挿入、及びアミノ酸点変異ライブラリーを作製した例をご紹介いたします。

図1．KOD -Plus- Mutagenesis Kit外観
変異導入に必要な全ての試薬及び詳細なプロトコールが添付されています。

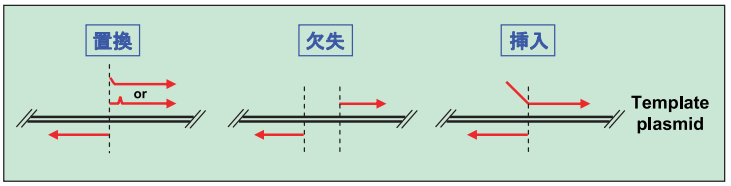


図2．Inverse PCR法における置換、欠失、挿入の各変異導入プライマーの設計例

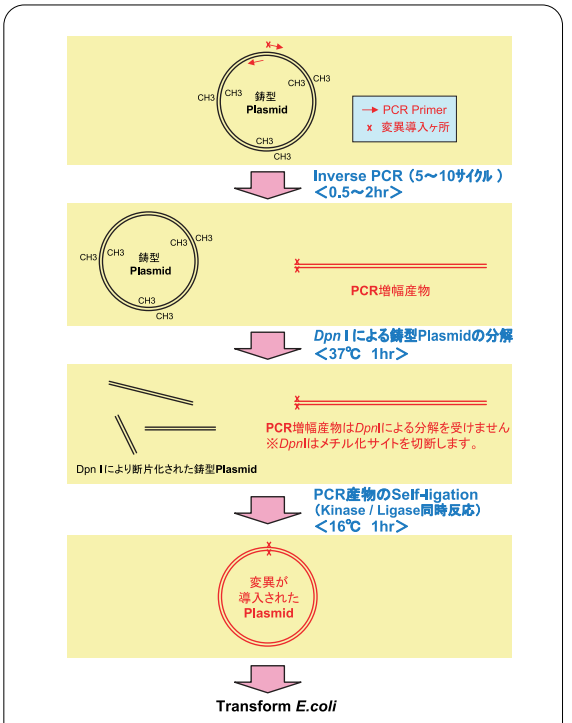


図3．KOD - Plus- Mutagenesis Kitを用いたInverse PCR法による変異導入フロー

ルシフェラーゼ遺伝子へのHis-tag配列の挿入

方　法

新規高発光ルシフェラーゼ:Emerald Luc（⇒一口メモ参照）の発現plasmid（大腸菌用）を鋳型として、タグ配列の導入実験を行いました。

プライマーは、図4に示すように、開始コドン直後にヒスチジンが6残基連続して挿入されるように設計しました。すなわち、開始コドン直後の配列（20塩基）に、ヒスチジン6残基をコードする配列CATCACCATCACCATCACを5’側に付加し、Primer#1としました。また、逆方向のprimerには、開始コドンの位置から25merの相補鎖をPrimer#2としました。

PCR、*Dpn*I処理、リン酸化、及びライゲーションの工程は、キット添付の取扱説明書に従い、最終的に大腸菌コンピテントセルDH5α（Code No.:DNA-903）の形質転換を行いました。

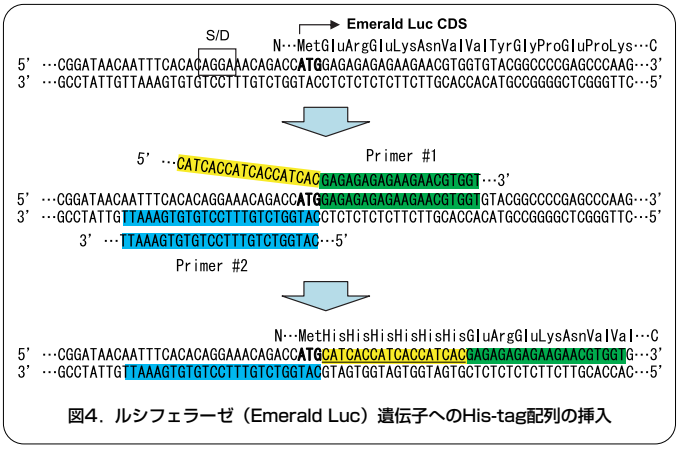


図4．ルシフェラーゼ（Emerald Luc）遺伝子へのHis-tag配列の挿入

結果及び考察

形質転換後、得られたコロニーから12クローンをサンプリングして、シーケンシングを行いました。その結果、12クローン全てにおいてHis-tag配列をコードする塩基配列の挿入が確認できました。

また、実際に変異導入遺伝子がHis-tag融合タンパク質として発現されることを確認するため、His-tag配列を挿入したplasmidを有する大腸菌を培養した後、His-tag融合タンパク質精製キットMagExtractor™ -His-tag-（Code No.:NPK-701）を用いてルシフェラーゼの精製を行いました。その結果、精製タンパク質は、SDS-PAGEにて予想通りの位置にバンドを示すとともに、発光基質を加えることにより発光を検出することもできました（図5）。

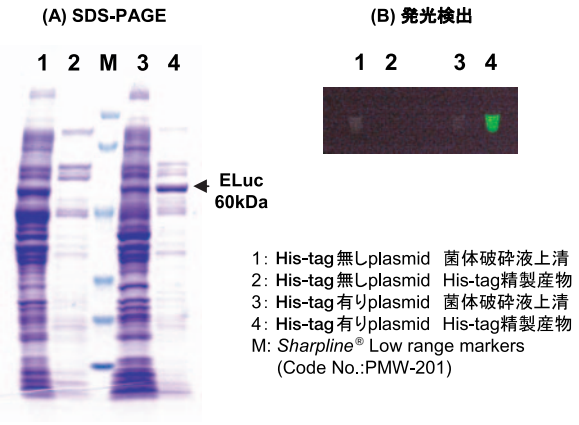


図5. His-tag配列を挿入したルシフェラーゼ（ELuc）のHis-tag精製結果（A）及び精製ルシフェラーゼの発光による検出（B）

ーロメモ

●His-tag配列について

His-tag配列は、ヒスチジン残基が数個以上連続した配列です。ヒスチジン側鎖のイミダゾール環が金属イオン（Ni^{2+}など）をキレートするため、金属イオンと強く結合する性質を有しています。そのため、目的のタンパク質と本配列を融合した形で発現させた産物は、金属イオンを固定化したビースなどにより簡便に精製することが可能です。　なお、本欄では、開始コドン直後のN末にHis-tagを挿入しましたが、目的タンパク質の高次構造によってはC末端に付加した方が良い精製結果が得られる場合もあります。特に、目的タンパク質がN末端にシグナル配列を持つ場合には、C末端に付加する必要があります。

●Emerald Lucについて

ブラジル産ヒカリコメツキムシ由来のルシフェラーゼです。従来のホタルルシフェラーゼに比べ、生細胞において安定で強い発光を観察することができるという特長があります。本誌p1～3をご参照ください。

ルシフェラーゼ遺伝子のアミノ酸点変異ライブラリーの作製（Saturation Mutagenesis）

次に、T. Nakatsu らの文献（*Nature.* 2006 Mar 16;440（7082）:372-6.）を参考に、Emerald Lucの発光波長に関与していると予想される282番目のイソロイシン（Ile）をターゲットにアミノ酸点変異ライブラリーを作製しました。

方　法

プライマーは、図6に示すように、282番目のIleに対応するコドンの位置をNNNにして、3箇所に4種類全ての塩基（すなわち64通りの塩基の組み合わせ）が挿入されるように設計しました。これをPrimer#3とし、また、逆方向のprimerには、背中合わせの25merの相補鎖をPrimer#4としました。これらのprimerを用いてキット添付の取扱説明書に従い変異導入を実施し、大腸菌コンピテントセルDH5α（（Code No.:DNA-903）の形質転換を行いました。

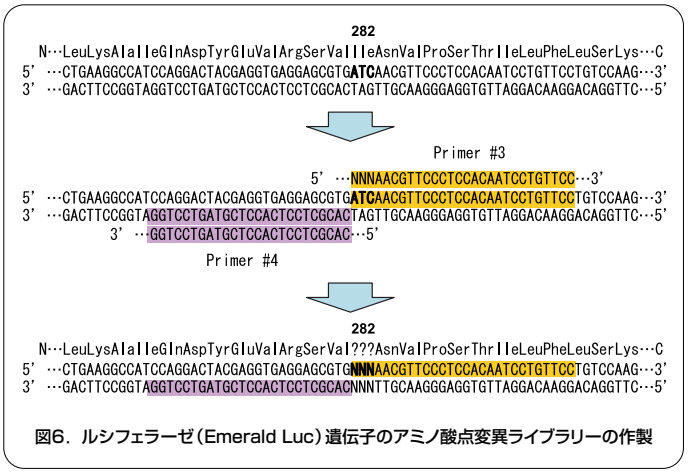


図6. ルシフェラーゼ（Emerald Luc）遺伝子のアミノ酸点変異ライブラリーの作製

結果及び考察

形質転換後、得られたコロニーから96クローンをサンプリングしてシーケンシングを行い、変異導入部位の塩基配列を調べました。その結果（表1）、GGGの9クローンを最多に、39種類の異なるコドンを持つ変異体を得ることができました。これらは、アミノ酸レベルでは、Gln, Lysを除く18種類のアミノ酸に対応し、野生型のIle以外に17種類の変異体が得られたことになります。今回は、96クローンのみのスクリーニングでしたが、n数を増やして行うことにより、さらに幅広い変異体を取得することができると考えられます。

次に、実際にこれらのルシフェラーゼ変異体の発光波長が変化しているかを調べるために、上で得られた17種類の変異体及び野生型を培養し、それらの発光スペクトルの測定を行いました（図7）。その結果、測定できた変異体では、最大発光波長（λmax）が赤色側へシフトしていることが観察できました（表2）。

表1．変異導入部位の塩基配列解析結果（得られたクローンのコドンとその個数）

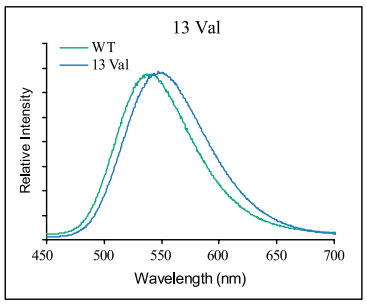
No.	コドン	アミノ酸	クローン数
1	GGG	Gly	9
2	GCC	Ala	6
3	GTT	Val	5
4	GGT	Gly	4
5	ATG	Met	4
6	GTA	Val	4
7	GTG	Val	4
8	GCT	Ala	3
9	CGT	Arg	3
10	CAT	His	3
11	CTT	Leu	3
12	GCG	Ala	2
13	AGA	Arg	2
14	GAC	Asp	2
15	GGC	Gly	2
16	AGC	Ser	2
17	TGG	Trp	2
18	GCA	Ala	1
19	AGG	Arg	1
20	CGG	Arg	1
21	AAT	Asn	1
22	TGT	Cys	1
23	GAA	Glu	1
24	GAG	Glu	1
25	GGA	Gly	1
26	CAC	His	1
27	ATT	Ile	1
28	CTG	Leu	1
29	TTC	Phe	1
30	CCC	Pro	1
31	CCG	Pro	1
32	TCA	Ser	1
33	TCT	Ser	1
34	ACA	Thr	1
35	ACC	Thr	1
36	ACG	Thr	1
37	ACT	Thr	1
38	TAT	Tyr	1
39	GTC	Val	1
40	CGA	Arg	0
41	CGC	Arg	0
42	AAC	Asn	0
43	GAT	Asp	0
44	TGC	Cys	0
45	CAA	Gln	0
46	CAG	Gln	0
47	ATA	Ile	0
48	ATC	Ile	0
49	CTA	Leu	0
50	CTC	Leu	0
51	TTA	Leu	0
52	TTG	Leu	0
53	AAA	Lys	0
54	AAG	Lys	0
55	TTT	Phe	0
56	CCA	Pro	0
57	CCT	Pro	0
58	AGT	Ser	0
59	TCC	Ser	0
60	TCG	Ser	0
61	TGA	Stop	0
62	TAA	Stop	0
63	TAG	Stop	0
64	TAC	Tyr	0
Primer内に塩基欠質等がある			12
配列解析不可			2
合計			96

表2．本実験で得られたルシフェラーゼ変異体の最大発光波長

No.	282番目アミノ酸種類	最大発光波長 λmax (nm)
1	Asn	575
2	Thr	550
3	Ser	560
4	Met	565
5	His	ND
6	Pro	ND
7	Arg	ND
8	Leu	ND
9	Glu	ND
10	Asp	ND
11	Ala	560
12	Gly	564
13	Val	552
14	Tyr	557
15	Trp	ND
16	Cys	558
17	Phe	563
18	Ile (Wild Type)	541

ND:Not Determined

＊図7及び表2は、産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門　近江谷克裕先生、中島芳浩先生にご提供いただきました。



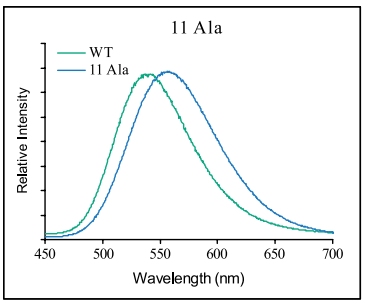


図7．Val変異体及びAla変異体の発光スペクトル（一例）

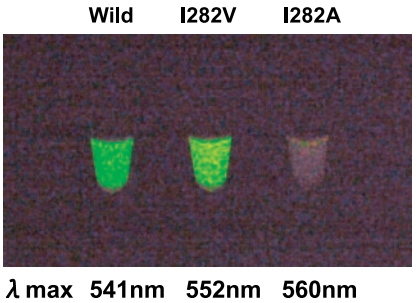


図8．野生型、Val変異体、及びAla変異体の発光

まとめ

KOD -Plus- Mutagenesis Kitを用いたInverse PCR法では、本稿でご紹介したtagの挿入やアミノ酸点変異ライブラリーの作製などに加え、数100bpの欠失等、様々な変異導入が可能です。KOD - Plus- Mutagenesis Kitを是非一度お試しください。

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD -Plus- Mutagenesis Kit	20回用	-20℃	SMK-101	¥38,000

＊本製品には、以下の試薬が含まれています。KOD -Plus-, 10x Buffer for iPCR, 2mM dNTPs, *Dpn* I, T4 Polynucleotide Kinase, Ligation high, Control Plasmid, Control Primer #1, Control Primer #2.

新規タグ

ACP & MCP-tag System

■詳細な実施例等はcovalys社のホームページ：
http://www.covalys.com/でご覧いただけます。

ユニークなin vivoタグラベリングシステムです。膜タンパク質の研究に最適です。

ACP-tagおよびMCP-tagは*E.coli*のACP（Acyl carrier protein）を基に開発された、約8kDaのタンパク性のタグです（MCP-tagはACP-tagの変異体）。主に、膜タンパク質（細胞外ドメイン）との融合タンパク質として発現させて使用します。CoA substrate（Coenzyme A [CoA]）の蛍光誘導体）と、ACP-SynthaseもしくはSFP-Synthaseを反応させることで、CoA Substrateの蛍光基を含む一部が、図1および2に示すようにACP-tagもしくはMCP-tagのセリン残基に共有結合します（特異性が異なります⇒図1、2をご参照ください）。

本システムは、各種プラスミド（タグ配列の供給）、各種Synthase（キットに凍結乾燥した状態で供給されます）、および3種類のCoA Substrateからなります。それぞれの色素（CoA-488、CoA-547、およびCoA-647）は、Fluorescein、Cy3、およびCy5とほぼ同じ波長域をカバーします（CoA-488はFluoresceinより優れた耐光性を示します）。本色素は、細胞浸透性が低く、細胞内へ浸透しにくいため、バックグラウンドを低く抑えて解析できるという利点があります。

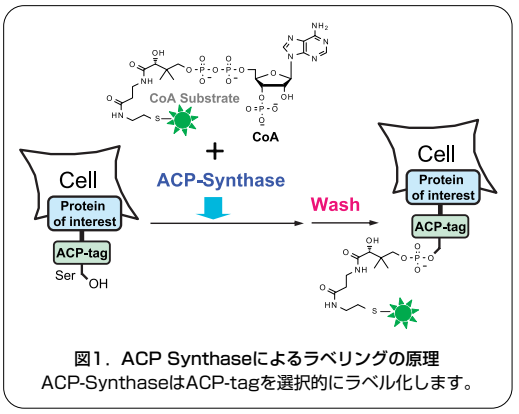


図1．ACP Synthaseによるラベリングの原理
ACP-SynthaseはACP-tagを選択的にラベル化します。

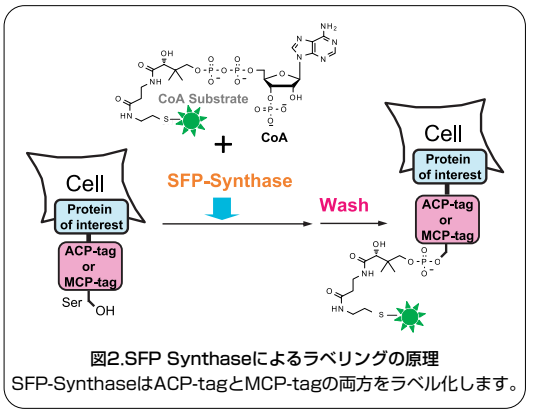


図2.SFP Synthaseによるラベリングの原理
SFP-SynthaseはACP-tagとMCP-tagの両方をラベル化します。

特長1 様々なラベルが可能

・CoA-488、CoA-547、およびCoA-647の3種類のCoA Substrateでラベルできます。また、ACP Synthaseの後に、SFP Synthaseを作用させることによる、ACP-tagとMCP-tagを用いるデュアルラベリングなども可能です。さらに、SNAP™-tagなどのシステムを併用することもできます。

特長2 パルスチェース実験・FRET実験に最適

・リセプターのインターナリゼーション実験など様々なパルスチェース実験に応用できます。また、CoA-547、およびCoA-647を用いてFRET実験が可能です。リセプターの2量体化の計測などに有効です。

特長3 少ない立体障害

・ACP-tagおよびMCP-tagは8kDaと小さく、立体障害を抑えて実験することができます。

実施例1 酵母細胞壁タンパク質（Sag1p）の解析

（論文1から引用。論文では製品とは異なる色素を用いて検討を行っています）

Saccharomyces cerevisiae Sag1pは細胞分裂時に細胞分裂部位へ輸送され、細胞壁のβ1,6-glucanに共有結合することが知られています。この実験では、まず、ACP-Sag1pを発現させた酵母を、CoA-Cy3（緑:CoA-547に対応）でラベルした後（a）、CoA-Cy5（赤:CoA-647に対応）でラベルした後、観察しました（赤色色素でラベルして15分後〈b〉、150分後〈c〉）。矢印が出芽部分を示しています。d-hは、緑色素でラベルした細胞を、赤色色素でラベルして60分後、さらにCoA-Fluorescein（青:CoA-488に対応）でラベルして経時観察した結果を示します。iは緑色でラベルした細胞をα-factorで処理し、120分後に赤色でラベルした時の観察像を示しています。結果、経時的にSag1pの発現を観察することができました。

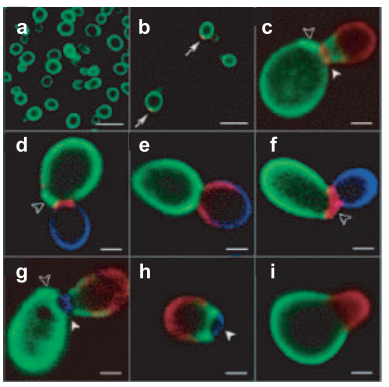


図3．酵母のSag1pのパルスチェース実験

実施例2 GPCR NK1Rの2量体化の検討（FRETの応用）

（論文2から引用。論文では製品とは異なる色素を用いて検討を行っています）

GPCR（G Protein-coupled receptor）の1種であるNK1R（neurokinin-1 receptor）は単量体で存在していることが知られてきましたが、最近、2量体で存在している可能性も示唆されています。そこで、本実験では、ACP-tagをNK1RのN末端に融合させたタンパク質を発現させたHEK293細胞に、2種類の色素基質を同時に添加する検討を行いました。理論上、NK1Rが2量体化することによってDonorとAcceptorが結合した（図4）のような組み合わせが生じるため、FRETが観測されることが予想されます。

この実験では、2種類の方法（安定発現〈Stable〉と一過性発現〈Transient〉）で発現させた細胞を用いました（安定発現よりも一過性発現の方が、約2.5倍NK1Rが発現します）。もし、NK1Rが2量体で存在した場合、添加するACP substrateのAcceptor濃度一定で、Donorの比率を徐々に増やして添加することにより、FRETがより強く観察されるようになるはずです。結果、一過性発現した方のみに、FRETによる蛍光の増大が認められ（図5）、NK1Rは過剰発現することにより、2量体化することが示唆されました。

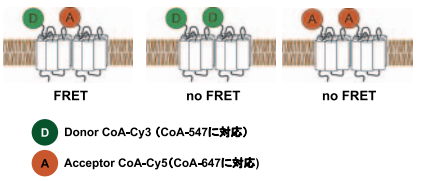


図4．FRET実験の概念図

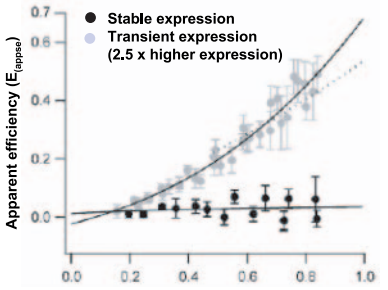


図5．リセプター発現量とFRETとの関係

参考文献

1）Vivero-Pol L. et al., *J. AM. CHEM. SOC.* **127**: 12770-12771（2005）
2）Meye B. H. et al., *Proc. Natl. Acad.* USA, **103**: 2138-2143（2006）

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
危 **ACP Trial Kit***	1Kit	-80℃	CVAC171	¥71,000
危 **CoA Substrate 50 Kit CoA-488**	50nmol	-20℃	CVSV126	¥35,000
危 **CoA Substrate 150 Kit CoA-488**	150nmol	-20℃	CVAC159	¥86,000
危 **CoA Substrate 50 Kit CoA-547**	50nmol	-20℃	CVSV124	¥35,000
危 **CoA Substrate 150 Kit CoA-547**	150nmol	-20℃	CVAC161	¥86,000
危 **CoA Substrate 50 Kit CoA-647**	50nmol	-20℃	CVSV162	¥35,000
危 **CoA Substrate 150 Kit CoA-647**	150nmol	-20℃	CVAC162	¥86,000
危 **CoA Substrate 50 Kit CoA-Biotin**	50nmol	-20℃	CVSV154	¥37,000
危 **CoA Substrate 150 Kit CoA-Biotin**	150nmol	-20℃	CVAC212	¥93,000
CoA-SH Building Block	2mg 10mg	-20℃	CVBB216 CVBB217	¥27,000 ¥95,000
ACP-Synthase	10nmol 30nmol	-80℃	CVAC168 CVAC169	¥66,000 ¥135,000
SFP-Synthase	10nmol 30nmol	-80℃	CVPC204 CVPC205	¥66,000 ¥135,000
ACPwt-source plasmid pASwt**	5μg	-20℃	CVPL122	¥25,000
MCP-source plasmid pMCP**	5μg	-20℃	CVPL206	¥27,000
ACP-express Transient Expression Kit***	1Kit	-20℃	CVPL170	¥52,000
MCP-express Transient Expression Kit***	1Kit	-20℃	CVPL207	¥56,000

危：本キットのパーツには、消防法における第4類第3石油類（等級III）であるジメチルスルホキシド（DMSO）が含まれます。可燃性がございますので、お取扱いにはご注意ください。

※CoA-substrate 50nmolは10ml、150nmolは30mlのラベル溶液として用いることができます。各Synthase 10nmolは10ml、30nmolは30mlのラベル溶液として用いることができます。

＊ ACP-tag Trial Kitは以下のような組み合わせからなるトライアルキットです。
- CoA-488 25nmol
- CoA-547 25nmol
- ACPwt-Synthase 5nmol ×2
- pAEMXT-ACPwt-GPI control plasmid 5μg
- DMSO 0.5ml

＊＊pASwt、およびpMCPはACP-tag配列及びMCP-tag配列の供給用プラスミドです。PCRで増幅し、目的のベクターへ移し変えて使用します。

＊＊＊ACP-express Transient Expression Kitは、以下の2種類のベクターを含みます。
- pAEMXT-ACPwt expression plasmid……動物細胞での発現プラスミド。CMVプロモーターの下流にMCSが設計されています。
- pAEMXT-ACPwt-GPI control plasmid……膜上に発現することが知られているGPI（Glcosylphosphatidyl inositol ancker）とACPの融合タンパク質を発現します。実験のコントロールとして使用します。MCP-express Transient Expression Kitは、ACP配列がMCP配列に置き換わっている以外はほぼ同じプラスミドからなります。

Dualsystems Biotech

高効率動物細胞発現ベクター

Mammalian expression vectors

特長 1 高発現

・強力なCMVプロモーターにより高効率な発現を実現します。一過性、及び安定発現の両方が可能です。

特長 2 HAタグを付加

・HAタグをNもしくはC末端に付加可能です。*Sfi*Iサイトを用いて簡単にクローニング可能です。

＜輸送・保存：室温＞

品　名	包　装	Code No.	価　格
pHA-MEX expression vector	5μg	DSP03401	¥110,000
pMEX-HA expression vector	5μg	DSP03402	¥110,000

※詳しくは、http://www.dualsystems.com/をご覧ください。

PEPROTECH INC.

New Cytokines

＜輸送・保存：-20℃＞

品　名	包装	Code No.	価　格
Human GDF-15/MIC-1	20μg	PT12028	¥39,000
Recombinant Human BMP-7/OP-1	10μg	PT12003	¥39,000
Recombinant Human Endostatin	100μg	PT15001	¥39,000
Recombinant Human Epigen	25μg	PT10051	¥39,000
Recombinant Human IL-33	10μg	PT20033	¥39,000
Recombinant Human Noggin	20μg	PT12010D	¥39,000
Recombinant Human PDGF-CC	20μg	PT10000CC	¥39,000
Recombinant Human Vaspin	20μg	PT13011	¥39,000
Recombinant Murine β-NGF	20μg	PT45034	¥39,000
Recombinant Human Visfatin	25μg	PT13009	¥39,000
Recombinant Murine FGF-basic	50μg	PT45033	¥39,000
Recombinant Murine IL-12 p80	10μg	PT21012p80	¥39,000
Recombinant Murine IL-17A	25μg	PT21017	¥39,000
Recombinant Murine Neuropoietin	25μg	PT25025B	¥39,000
Recombinant Murine Noggin	20μg	PT25038	¥39,000

※詳しくは、http://www.peprotech.com/をご覧ください。

covalys

SNAP-tag™用リンカーシリーズ

SNAP-tag™ Substrate Building Blocks

SNAP-tag™は、約20kDaの酵素タグであり、ベンジルグアニン（BG）基を有する人工基質と共有結合を形成する性質を有します。本リンカーシリーズを用いることで、様々な固相にSNAP-tag™融合タンパク質を固定化することができます。

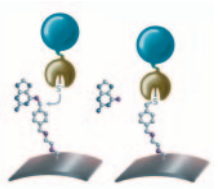


図1．SNAP-tag™の固定化反応

特長 1 様々な用途に応用可能

・様々な官能基を持つBGリンカーから選択可能です。

特長 2 センサー表面へのタンパク質の固定化に最適

・BG-PEG-NH_2やCBG-NH_2は、センサー表面へのタンパク質の固定化に最適です。

<輸送・保存：-20℃>

品　名	包　装	Code No.	価　格
BG-NH_2	2mg 10mg	CVBB029 CVBB028	¥52,000 ¥213,000
BG-PEG-NH_2	2mg 10mg	CVBB030 CVBB203	¥52,000 ¥213,000
BG-GLA-NHS	2mg 10mg	CVBB186 CVBB187	¥52,000 ¥213,000
BG-N_3	2mg 10mg	CVBB188 CVBB189	¥52,000 ¥213,000
BG-Maleimide	2mg 10mg	CVBB190 CVBB191	¥52,000 ¥213,000
BG-GLA	2mg 10mg	CVBB209 CVBB210	¥52,000 ¥213,000
BG-PYN	2mg 10mg	CVBB192 CVBB193	¥52,000 ¥213,000
CBG-NH_2*	2mg 10mg	CVBB200 CVBB201	¥52,000 ¥213,000
SNAP-source plasmid pSS26b	5μg	CVPL022	¥25,000
SNAP-source plasmid pSS26m	5μg	CVPL023	¥25,000

＊CBG-NH_2は、CM5センサーチップなどの表面修飾に最適です。

※SNAP-tag™の研究用途での使用に際しましては書面等による契約は一切必要ありませんが、リンカー等をCovalys社以外から購入する場合はライセンス契約が必要です。

※pSS26b及びmは、それぞれバクテリア、及び哺乳類での発現に適するようにSNAP-tag™のコドンを改変してあります。このベクターからSNAP-tag™配列を切り出し、目的の遺伝子と融合させて使用します。また、発現ベクターになったタイプもございます。詳しくは、弊社ウェブサイトをご参照ください。

※詳しくはhttp://www.covalys.com/をご覧ください。

●5パック包装を開始しました。

ご好評いただいております下記商品の5パック包装での販売を開始いたしました。まとめてご注文いただくときにお得です。お届けする商品は、通常包装を5パックまとめた形態となります。

品名及び内容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
Blend Taq® -Plus-	250U×1本	-20℃	BTQ-201	¥21,000
	250U×5本	-20℃	BTQ-201X5	¥90,000
Realtime PCR Master Mix	1mL×5本 (200回用)	-20℃	QPK-101	¥37,000
	1mL×25本 (1000回用)	-20℃	QPK-101X5	¥170,000
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	1mL×5本 (200回用)	-20℃	QPK-201	¥37,000
	1mL×25本 (1000回用)	-20℃	QPK-201X5	¥170,000
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-	1mL×5本 (200回用)	-20℃	QPK-211	¥37,000
	1mL×25本 (1000回用)	-20℃	QPK-211X5	¥170,000
***RNA-direct*™ Realtime PCR Master Mix**	0.5mL×5本 (100回用)	-20℃	QRT-101	¥33,000
	0.5mL×25本 (500回用)	-20℃	QRT-101X5	¥150,000
***RNA-direct*™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix**	0.5mL×5本 (100回用)	-20℃	QRT-201	¥33,000
	0.5mL×25本 (500回用)	-20℃	QRT-201X5	¥150,000

※5パックのご注文コードは、通常包装コードの末尾にX5（エックス5）を付けたものになります。

●新カタログ発刊のお知らせ

バイオ機器カタログ2007春号、サンタクルーズ社カタログ '07を発刊いたしました。弊社ウェブサイトの、『お問い合わせ・ご請求』のコーナーからご請求いただけます。

●メルマガ好評配信中

弊社メルマガ「TOYOBOバイオニュース」を毎月配信しております。商品紹介の他に、「ワンポイントアドバイスQ&A」や「西海岸。の風に吹かれて」「昼休みのベンチ」などの各種エッセイもお届けしております。弊社ウェブサイト（http://www.toyobo.co.jp/bio/）の「今月のイチオシ!」コーナーからご登録いただけます。

●AnaSpec社、および株式会社ナード研究所製品の取扱い終了のお知らせ

ペプチド等でご好評いただいておりましたAnaSpec社、およびPhos-tag® Biotinでご愛顧いただいておりました株式会社ナード研究所製品の、弊社での取扱いを終了いたしました。長い間ありがとうございました。

実験川柳特集 2

皆様、沢山のご投句ありがとうございました。一回では掲載しきれませんので、今回から数回に分けてお届けいたします。本コーナーは、弊社ウェブサイト（www.toyobo.co.jp/bio）の「読者のコーナー」でもご覧いただけます。

DNA　ほどけてゆくよ　春の風

匿名希望　ノコダゾールとまれ さん

●ノコダゾール　とまれ　さんのコメント:
「一応、"春の風"と"ヘリカーゼ"をかけています。」

【句評】う、美しい。情景が目に浮かぶようです。
ところで、ノコダゾールって、細胞周期を同調させたりするときに使う試薬ですよね。ということは、“細胞周期”と“季節”もかけられているのでしょうか？ この川柳、細胞が一気にM期へ向かう情景を春への季節変化になぞらえているとも解釈できます。深すぎます。

コロニーの　見えぬシャーレの　やるせなさ

匿名希望　PCR不調 さん

【句評】一日分の時間をロスしてしまったという朝の脱力感をうまく捉えていますね。

X-gal　サンプル染まらず　青ざめる

匿名希望　藝侘 さん

【句評】PCR不調さんの句と対をなすといっても良いかも知れません。自分の実験の失敗から来る脱力感と、第3者から受けるであろう何らかの圧力の予感を微妙に表現していると思います。

それ取って　プラッツ越しに　芽生える愛

匿名希望　“ち”さん

【句評】研究室にもドキドキする瞬間があってもいいですよね。いつもの研究室がより新鮮に見える瞬間を切り取ったすばらしい感性を感じます。

認めます　私の実験　無理がある

匿名希望　“ち”さん

【句評】この状況、私にも良くあります。でも意地もありますよね。

⇒弊社ウェブサイト（読者のコーナー＞ご投稿コーナー）からご投句いただけます。
http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience/tech/reader/contribute/index.html
採用になった方には、￥2,000の図書カードと認定証をご進呈いたします。奮って投句ください（一人何句でも結構です）！

ISO 9001 登録

東洋紡績株式会社の敦賀バイオ工場／敦賀バイオ研究所はLloyd,s Register Quality Assurance(LRQA)により日本はもとよりイギリス、アメリカ、オランダ、ドイツ、オーストラリアにおいてもISO 9001の認証登録されております。
本誌掲載の商品の内、本工場で製造されております制限酵素(Restriction Endonucleases)ならびに修飾酵素(Modifying Enzymes)は、品質マネジメント・システム沿って管理・運営・維持されております。

ISO 14001 登録

東洋紡績株式会社のつるが工場は環境マネジメントシステムに係る日本の認定機関である（財）日本適合性認定協会（JAB）に審査機関の認定を受けた日本検査キューエイ協会（JIC Quality Assurance Ltd.）によりISO14001の認証登録されております。東洋紡績株式会社敦賀バイオ事業所はつるが工場の環境マネジメントシステムの適用を受け活動を推進しており、敦賀バイオ事業所の製造するバイオ関連商品はISO14001の認証を受けた工場／研究所で開発、製造されています。

NOTICE TO PURCHASER :
LIMITED LICENSE

●PCR関連商品のラベルライセンスについての詳細は、弊社ウェブサイト（www.toyobo.co.jp/bio）［PCR関連コーナー］をご覧ください。

●本ページ掲載の試薬類は全て一般研究用の目的にのみ販売しており、医薬品、診断用医薬品、化粧品、食品用等には使用できませんので、十分ご注意ください。誤用による事故については、当社は一切の責任を負いません。
●本ページ掲載商品にには消費税は含まれておりません。実際のご購入価格については弊社代理店へお問い合わせください。
●本ページ中の略号:毒印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外毒物です。劇印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外劇物です。危印は消防法に基づく危険物です。